



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

Lactobacillus brevis 와 *Aspergillus*
oryzae 를 이용한 콩, 다시마 혼합
발효물의 γ -aminobutyric acid 생산과
angiotensin-I converting enzyme 저해
효과

γ -Aminobutyric Acid Production and Angiotensin-I
Converting Enzyme Inhibitory Activity of Fermented
Soybean Containing Sea Tangle by the Co-culture of
Lactobacillus brevis with *Aspergillus oryzae*

2015년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

장 은 경

Lactobacillus brevis 와 *Aspergillus oryzae* 를
이용한 콩, 다시마 혼합 발효물의 γ -aminobutyric
acid 생산과 angiotensin-I converting enzyme
저해 효과

γ -Aminobutyric Acid Production and Angiotensin-I
Converting Enzyme Inhibitory Activity of Fermented
Soybean Containing Sea Tangle by the Co-culture of
Lactobacillus brevis with *Aspergillus oryzae*

지도교수 지 근 역

이 논문을 생활과학 석사학위논문으로 제출함

2014 년 10 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

장 은 경

장 은 경의 생활과학 석사학위논문을 인준함

2014 년 12 월

위 원 장 : _____ (인)

부위원장 : _____ (인)

위 원 : _____ (인)

국 문 초 록

감마아미노부티르산 (γ -aminobutyric acid, GABA)은 중추신경계의 억제성 신경전달 물질로 항 고혈압, 알코올 대사 촉진, 항 스트레스 등 다양한 생리 활성이 알려져 있고, 안지오텐신-I 전환 효소 저해제 (angiotensin-I converting enzyme inhibitors, ACEI)는 안지오텐신-I 전환 효소의 활성을 억제하여 혈압 상승 물질인 안지오텐신-II의 생성을 줄이고 혈압강하성 펩타이드인 브래디키닌 (bradykinin)의 분해를 억제하는 역할을 한다.

본 연구에서는 GABA와 ACE inhibitory activity의 공통점인 항 고혈압 기능성에 주목하여, 식품 유래 미생물을 이용한 ACE 저해 활성과 GABA의 함량이 증대된 콩 발효식품을 개발하는 것을 목표로 하였다.

다시마는 천연 글루탐산 원료로서 GABA 생성을 증대시키기 위한 발효 조건으로 추가하였고 콩, 다시마 혼합물을 7 일간 단기 발효 시 GABA 생성을 위한 최적 발효 조건은 *Aspergillus oryzae* FMB S46471 (발효 시작일 접종, 10^4 spores/mL) 과 *Lactobacillus brevis* GABA 100 (발효 3 일차 접종, 1%; 10^8 CFU/mL, v/v)의 공동 배양, 30℃, pH 5.0, 다시마 분말 첨가, 수분 첨가량 30 mL 이상으로 나타났다.

GABA 생성을 위한 최적 발효 조건을 적용했을 때 콩, 다시마 혼합 발효물의 GABA 함량은 최대 1.9 g/kg으로 나타났다. 이 조건에서 ACE 저해 활성은 최대 96%를 보였고, 1:100 비율로 희석 후 소화 효소를 처리한 후에도 약 40%의 저해 활성을 나타냈다.

콩, 다시마 혼합 발효물의 가수분해물에서 분자량 3 kDa 미만 분획은 IC_{50} 가 11.69 μ g/mL로 ACE 저해 활성이 가장 높았고, nanoLC-ESI/MS/MS로 분석한 결과 9 종의 펩타이드가 있음을

확인 하였다.

본 연구에서 개발한 콩, 다시마 혼합 발효물은 GABA 함량 및 ACE 저해 활성이 높은 점을 토대로 혈압 조절을 위한 기능성 식품 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Keywords

γ -Aminobutyric acid (GABA), *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus oryzae*, Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity, Soybean (*Glycine max*), Sea tangle (*Saccharina japonica*)

Student Number: 2013-21510

목 차

국문초록	i
목 차	iii
그림목차	iv
표 목 차	v
약어요약	vi
1. 서 론.....	1
2. 실험재료 및 방법.....	3
2.1. 사용 균주 및 배양 조건.....	3
2.2. 콩, 다시마 혼합 발효물의 제조.....	5
2.3. 콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 생성 최적 발효.....	7
2.4. HPLC를 이용한 유리 아미노산 정량분석.....	12
2.5. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성 측정.....	14
2.6. <i>in vitro</i> 소화 시뮬레이션.....	16
2.7. ACE 저해 활성 분획의 구성 펩타이드 확인.....	17
3. 실험결과 및 고찰.....	18
3.1. <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> 와 <i>L. brevis</i> 의 GABA 생성능 비교.....	18
3.2. 콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 생성 최적 발효 조건.....	20
3.3. HPLC를 이용한 유리 아미노산 정량 분석.....	31
3.4. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성.....	34
3.5. ACE 저해 활성 분획의 구성 펩타이드 확인.....	38
4. 요약 및 결론.....	41
참고문헌	42
Abstract in English.....	47

그 립 목 차

Fig 1. Production of amino acids and GABA by <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>L. brevis</i> GABA 100	19
Fig 2. Effect of inoculation time point of <i>L. brevis</i> GABA 100 on the GABA production.....	22
Fig 3. Effect of fermentation temperature for GABA production in SB-STE.....	24
Fig 4. Effect of various carbohydrates added into SB-STE on the production of GABA	26
Fig 5. Effect of various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle.....	29
Fig 6. Effect of different water content on GABA production.....	30
Fig 7. ACE inhibitory activities of fermented soybeans depending on the inoculation combination.....	34
Fig 8. The ACE inhibitory activity by various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle	35
Fig 9. Changes of the ACE inhibitory activity from uninoculation to digestion	36
Fig 10. The ACE inhibitory activity of the short-course fermentation (G11) and traditional fermented soybean products in market ...	37

표 목 차

Table 1. The various inoculation with different microorganisms	8
Table 2. The various medium compositions with different ratios of soybean, sea tangle, and water	11
Table 3. Operation conditions of HPLC analysis to determine contents of free amino acids	13
Table 4. Operation conditions of HPLC analysis of ACE inhibitory activity	15
Table 5. Change of free amino acids in fermented soybeans during fermentation	33
Table 6. The ACE inhibitory activities of fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated by molecular weight....	38
Table 7. Identified peptides in fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated below 3 kDa	40

약 어 요 약

ACE : Angiotensn-I converting enzyme

ACEI : Angiotensn-I converting enzyme inhibitor

ACN : Acetonitrile

A. oryzae : *Aspergillus oryzae* FMB S46471

B. subtilis : *Bacillus subtilis* natto

DW : Distilled water

GABA : γ -Aminobutyric acid

GAD : Glutamic acid decarboxylase

LAB : Lactic acid bacteria

L. brevis : *Lactobacillus brevis* GABA 100

STE : Sea Tangle Extracts

STP : Sea Tangle Powder

TFA : Trifluoroacetic acid

1. 서론

발효한 콩은 단백질과 아미노산이 풍부한 영양 공급원으로서 소화율이 증가하고 기호성과 저장성이 증대된다는 장점도 있지만, 함유하고 있는 기능성 물질을 분리하거나 그 기능성 물질을 생성하는 발효 원리를 탐구하는 연구 소재로도 많이 이용되고 있다.

발효는 관여하는 미생물의 특성에 따라 풍미 변화뿐만 아니라 생성되는 생리 활성 물질도 다르기 때문에, 특정 균주를 사용한 발효는 얻고자 하는 기능 성분을 증대시킬 수 있는 기술로써 식품 산업에서 중요한 역할을 하고 있다.

콩 단백질은 발효 과정 동안 펩타이드와 아미노산으로 분해 되고 그 중 글루탐산 (glutamic acid)은 유리아미노산에서 주요 비율을 차지한다 (1). 일부 유산균은 글루탐산을 감마아미노부티르산 (γ -aminobutyric acid, GABA)으로 전환하는 효소를 분비하는데 글루탐산 탈탄산효소 (glutamic acid decarboxylase, GAD)에 의해 글루탐산이 알파-탈카르복실화 (α -decarboxylation) 되어 비가역적으로 GABA가 생성된다 (2, 3). GABA는 중추 신경계에서 신경전달 물질로 잘 알려진 비단백 아미노산으로 (4), 항 고혈압 (5-8), 항 불안 (9), 만성 알코올성 질환 예방 (10) 등 다양한 생리 활성을 가지고 있다. 하지만 일반 식품에는 GABA의 함량이 적기 때문에 (11), 현미 (12), 유제품 (13), 녹차 (14) 등 자주 섭취하는 식품에서 GABA 함량을 증가시키기 위한 연구들이 보고되었다.

또 다른 생리활성물질로 식품에서 유래한 안지오텐신-I 전환 효소 저해제 (angiotensin-I converting enzyme inhibitor)는 레닌-안지오텐신-알도스테론 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 시스템에 관여하여 혈압을 조절하는 기능성이 알려져 있다 (15). 안지오텐신-I 전환 효소 (angiotensin I-converting enzyme, ACE)는 RAAS에서 안지오텐신-I을 안지오텐신-II로 전환하여

혈관을 수축시키고, 혈압을 강하시키는 펩타이드인 브래디키닌 (bradykinin)을 불활성화시켜 혈압이 증가하게 된다. 기존의 연구들에 따르면, 카제인(casein) (16), 사케 (sake) (17), sour milk (18) 등에서 유래한 가수분해물에 의해 ACE 활성이 저해되었음을 확인하였고, 돌미역 (wakame) (19), 건조 가다랑어(dried bonito) (20)를 섭취한 본태성 고혈압 쥐 (spontaneously hypertensive rats, SHR)의 혈압이 감소하여 항 고혈압 효과가 있음을 입증하였다.

따라서 본 연구에서는 GABA 함량과 ACE 저해 활성이 높은 콩 발효물을 개발하는 것을 목표로 하고, GABA 함량을 증진시키기 위한 최적 발효 조건을 설정하였다. 발효 조건 중 천연 글루탐산 소스인 다시마의 첨가가 GABA 생성과 ACE 저해 활성에 미치는 영향을 분석하였고, GABA 함량과 ACE 저해 활성이 가장 높은 콩, 다시마 혼합 발효물에서 ACE 저해 활성이 가장 높은 분획을 구성하는 펩타이드에 대해 분자량과 아미노산 서열을 확인하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배양 조건

2.1.1. 실험재료 및 시약

콩 (soybean, *Glycine max*)과 다시마 (sea tangle, *Saccharina japonica*)는 각각 경기 농협과 부산 기장군 시장에서 국내산을 구입하였고 실온에서 보관하였다. L-monosodium glutamate (MSG)는 Yakuri Pure Chemicals Co. (Kyoto, Japan)에서 구매하였고 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, GABA, angiotensin I-converting enzyme (from rabbit lung), hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), hippuric acid (HA), glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, soluble starch는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Acetonitrile 과 trifluoroacetic acid는 각각 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)와 Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA)의 HPLC grade 제품을 사용하였다.

2.1.2. 사용 균주 및 배양 조건

Lactobacillus brevis GABA 100과 *Bacillus subtilis* natto는 각각 김치와 메주에서 분리한 균으로 서울대학교 식품영양학과 식품미생물연구실에서 보관 중인 균주를 사용하였다. *L. brevis* GABA 100은 0.05% (w/v) L-cystein-hydrochloride anhydrous (Cysteine) (Sigma-Aldrich Co., USA)를 함유하는 deMan-Rogosa Sharpe (MRS) broth 배지 (Difco™, Detroit, MI, USA)에 stock을 1% (v/v) 접종하고 37℃에서 18 시간 동안 혐기 배양하였다. 이 배양액을 새 MRS broth에 1% (v/v) 접종하여 동일한 조건으로 배양하였고, 생균수가 9.0 log viable colony forming units (CFU)/mL인 배양액을 실험에 사용 하였다.

B. subtilis natto 는 Luria-Bertani (Difco™, Detroit, MI, USA) broth 배지에 stock을 1% (v/v) 접종하고 170 rpm, 37℃에서 12 시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 새 LB broth 배지에 1% (v/v) 접종한 후 동일한 조건으로 한 번 더 배양하여 실험에 사용하였다.

Aspergillus oryzae FMB S46471은 메주에서 분리하였고 mycotoxin을 생성하지 않는 균주를 사용하였다 (21). *A. oryzae* FMB S46471는 potato dextrose agar (PDA) (Difco™, Detroit, MI, USA)에 접종하여 30℃, 호기 조건에서 7 일간 배양한 후 포자 현탁액을 준비하여 실험에 사용하였다.

2.1.3. *A. oryzae*의 포자 및 *B. subtilis*와 *L. brevis*의 생균수 측정

A. oryzae FMB S46471를 배양한 PDA agar 배지에 멸균한 증류수를 첨가한 후 멸균한 spreader로 표면을 문질러서 포자를 수득하였다. Haemocytometer를 이용하여 포자 수를 계산하였고, 10^6 spores/mL 농도로 포자 현탁액을 준비하여 *A. oryzae* FMB S46471의 접종량 조건에 맞춰 실험에 사용하였다.

L. brevis GABA 100의 생균수는 MRS agar 배지에 접종한 후 37℃에서 48 시간 동안 혐기 배양했을 때 나타난 colony 수를 측정하였다. *B. subtilis* natto 는 LB agar 배지에 접종하여 37℃에서 24 시간 호기 배양 후 나타난 colony 수를 확인하였다. 생균수는 log colony forming units (CFU)/mL 로 표시하였고, 3 반복한 결과를 제시하였다.

2.2. 콩, 다시마 혼합 발효물의 제조

2.2.1. 다시마추출물과 콩, 다시마 혼합 배지 (SB-STE)의 제조

콩과 건조 다시마는 분쇄기 (Hanil Electric Co., Korea)를 사용하여 분말로 준비하고 여분은 냉장 보관 (4℃) 하였다. 다시마 추출물 (sea tangle extract, STE)은 다시마 분말(sea tangle powder, STP) 2.5 g에 증류수 50 mL를 첨가하여 고압멸균기 (autoclave)로 121℃ 에서 15 분간 열수 추출 하였고, Whatman No. 5 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, United Kingdom)로 다시마의 불용 성분을 제거한 후 여과액을 다시마 추출물로 사용하였다.

GABA 생성을 위한 발효 최적화 연구에서는 콩 5 g에 다시마 추출물 50 mL를 첨가하여 증숙한 콩, 다시마 혼합물 (SB-STE)을 기본 배지로 사용하였다. 배지 구성이 변경되는 경우, 해당 실험에서 배지 구성을 별도로 기재하였다.

2.2.2. 콩, 다시마 혼합 배지 (SB-STE)의 발효

A. oryzae FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100의 접종은 GABA 생성을 위한 발효 최적화 연구에서 제시한 미생물의 접종 조합, 접종 시점, 접종량에 따라 진행하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 호기 조건으로 총 7 일간 진행하였고, 발효 0, 3, 5, 7 일차의 생균수와 pH를 측정한 후 1 mL씩 sampling 하여 -20℃에서 보관하였다.

2.2.3. TLC를 이용한 유리 아미노산 정성 분석

콩, 다시마 혼합 발효물 샘플을 14,000 $\times g$, 4°C 조건에서 3 분간 원심분리 하였고 상정액을 취하여 1:10 비율로 희석한 후 유리 아미노산 TLC 분석에 사용하였다. 희석한 샘플을 2 μL 취하여 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ plate (Merck, Germany) 에 점적하였고, standard는 L-monosodium glutamate (MSG)와 GABA를 각각 0.1% 농도로 1 μL 를 점적하였다. 이동상 (*n*-butanol : acetic acid : distilled water, 4:1:1, v/v/v) (Samchun pure chemical Co, Ltd., Korea)은 200 mL 을 준비하여 TLC chamber에 넣어 포화시킨 후 TLC 전개를 진행하였다. 전개가 완료되면 TLC plate를 건조한 후 2% ninhydrin solution (w/v, in absolute ethanol, Alfa Aesar, UK)을 분사한 후, dry oven에서 110°C 조건으로 1 분 30 초간 가열하였다 (22, 23).

2.3. 콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 생성 최적 발효

2.3.1. *A. oryzae*, *B. subtilis*와 *L. brevis*의 GABA 생성능 확인

A. oryzae FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성능 확인 실험은 Table 1의 내용에 따라 진행하였다. *A. oryzae* FMB S46471은 기본 배지 SB-STE에 5×10^4 spores/mL가 되도록 접종하였고, *B. subtilis* natto 와 *L. brevis* GABA 100은 1 % (v/v)를 접종하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

2.3.2. *L. brevis*의 접종 시점 및 *A. oryzae*와 *L. brevis*의 접종량에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

2.3.1.의 실험 결과를 토대로 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 GABA 생성을 위한 균주로 선택하였다. 접종 시점에 대한 GABA 생성 최적화 연구에서는 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 발효 시작일에 5×10^4 spores/mL로 접종하였고 *L. brevis* GABA 100의 접종시점을 각각 0, 3, 4, 5, 6 일차로 설정하여 1% (v/v) 접종하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

접종량에 대한 GABA 생성 최적화 연구에서는 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 각각 10^4 , 10^5 , 10^6 spores/mL를 발효 시작일에 접종하였고 *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 각각 1, 2, 3% (v/v)를 접종하여 총 9 개 그룹으로 구성하였다. 발효는 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 7 일간 진행하였다.

Table 1. The various inoculation with different microorganisms.

Group	Microorganism
A	<i>A. oryzae</i>
B	<i>B. subtilis</i>
G	<i>L. brevis</i>
AB	<i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i>
AG	<i>A. oryzae</i> , <i>L. brevis</i>
BG	<i>B. subtilis</i> , <i>L. brevis</i>
ABG	<i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. brevis</i>

A. oryzae, *Aspergillus oryzae* FMB S46471; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* natto; *L. brevis*, *Lactobacillus brevis* GABA 100.

Fermentation was conducted at 30°C, 150 rpm for seven days in SB-STE medium.

2.3.3. 발효 온도와 pH에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

2.3.1. 의 실험 결과를 토대로 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도와 최적 pH에 대한 연구를 먼저 수행하였다.

3% MSG를 함유한 MRS broth에 *L. brevis* GABA 100을 1% (v/v) 접종하여 각각 25, 30, 37℃에서 3 일간 혐기 배양하였고 생균수와 pH 변화는 24 시간 마다 확인하였다. 최적 pH 확인 실험은 3% MSG를 함유한 MRS broth를 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 의 5 가지 그룹으로 설정하여 3 M citric acid (Sigma-Aldrich Co., USA)로 pH를 조절한 후, *L. brevis* GABA 100 1% (v/v)를 접종하여 30℃에서 3 일간 혐기 배양하였다. 생균수와 pH 변화는 24 시간 마다 확인하였고 pH가 증가한 경우 3 M citric acid를 처리하여 각 실험군의 pH 조건을 유지할 수 있도록 모니터링 하였다. *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도와 pH는 TLC 분석법을 이용하여 각 조건에서 생성된 GABA 패턴을 비교하여 최적 조건을 선택하였다.

콩 발효 단계에서 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100의 GABA 생성 최적 온도를 확인하기 위해 SB-STE 배지에 *A. oryzae* FMB S46471을 발효 시작일에 접종 (5×10^4 spores/mL)하고 발효 온도를 각각 25, 30, 37℃로 설정한 후 150 rpm, 호기 조건에서 배양하였다. *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 모든 그룹에 접종 (1%, v/v) 하였고 shaking incubator에서 150 rpm, 30℃, 호기 조건으로 총 7 일간 발효를 수행하였다

pH가 미치는 영향을 확인하기 위해서는 SB-STE의 초기 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 설정하였고 위의 온도 실험과 동일한 조건으로 7 일간 발효를 진행하였다.

2.3.4. 탄소원 첨가에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

Glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, starch를 증류수에 용해하여 0.2 µm PVDF membrane filter (PALL Acrodisc® Syringe Filters, Ann Arbor, MI, USA)로 여과한 후 SB-STE 배지에 각각 1% 농도가 되도록 첨가하였다. *A. oryzae* FMB S46471는 발효 시작일에 5×10^4 spores/mL을 접종하였고, *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 1% (v/v) 접종한 후 탄소원을 각각 1% 농도가 되도록 한 번 더 첨가하였다. 발효 조건은 shaking incubator에서 150 rpm, 30°C, 호기 조건으로 총 7 일간 진행하였다.

2.3.5. 배지 내 콩, 다시마, 증류수 첨가 비율에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

배지를 구성하는 콩과 다시마, 증류수의 비율에 의한 GABA 생성 최적 조건을 확인하기 위하여 실험에서 사용한 배지 구성은 Table 2와 같다. 각 그룹별 배지 구성에 맞춰 100 mL 삼각플라스크에 첨가한 후 고압멸균기 (121°C, 15 분)에서 증숙 및 멸균하였다.

A. oryzae FMB S46471은 발효시작일에 5×10^4 spores/mL을 접종하였고, *L. brevis* GABA 100은 발효 3 일차에 1% (v/v) 접종하였고 shaking incubator에서 150 rpm, 30°C, 호기 조건으로 총 7 일간 발효를 진행하였다

Table 2. The various medium compositions with different ratios of soybean, sea tangle, and water, used for the fermentation and production of GABA.

Group	Composition of the steamed soybean					
	SB-STP			SB-STE		
	SB (g)	STP (g)	DW (mL)	SB (g)	STP (g)	DW (mL)
G1	5.0	–	50	–	–	–
G2	3.75	1.25	50	–	–	–
G3	2.5	2.5	50	–	–	–
G4	1.25	3.75	50	–	–	–
G5	–	5.0	50	–	–	–
G6	–	–	–	3.75	1.25	50
G7	–	–	–	2.5	2.5	50
G8	–	–	–	1.25	3.75	50
G9	–	–	–	–	5.0	50
G10	–	–	–	5.0	2.5	50
G11	5.0	2.5	50	–	–	–
D50	5.0	–	50	–	–	–
D30	5.0	–	30	–	–	–
D10	5.0	–	10	–	–	–
STE50	–	–	–	5.0	2.5	50
STE40	–	–	–	5.0	2.5	40
STE30	–	–	–	5.0	2.5	30
STE20	–	–	–	5.0	2.5	20
STE10	–	–	–	5.0	2.5	10

SB, soybean; STP, dried sea tangle powder; STE, sea tangle extract; DW, distilled water.

STE was prepared by extracting the sea tangle with DW in the autoclave at 121°C for 15 min, then STE was filtered through a filter paper to discard the sea tangle debris.

2.4. HPLC를 이용한 유리 아미노산 정량분석

콩, 다시마 혼합 발효물을 1 mL 취하여 micro refrigerated centrifuge (Hanil Science industrial Co., Korea)로 14,000 xg, 4℃에서 3 분간 원심분리한 후 상정액을 0.2- μ m PVDF membrane filter (PALL Acrodisc ® Syringe Filters, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하였다. HPLC를 이용한 아미노산 정량 분석은 서울대학교 농생명과학공동기기원 (National Instrument Center for Environmental Management, Seoul National University, Korea)에서 분석을 수행하였다. 콩 발효물의 유리 아미노산은 Ultimate 300 HPLC systems (Thermo Fisher Scientific, USA)로 분석하였고 VDSpher 100 C18-E column (4.6 x 150 mm i.d., 3.5 μ m; VDS optilab, Germany)을 사용하였다. HPLC를 이용한 유리 아미노산 분석 조건은 Table 3에 기재하였다. 1차, 2차 아미노산의 자동화 유도체화를 위해 borate buffer (Agilent Technologies), O-phthalaldehyde reagent (OPA, Agilent Technologies), 9-fluorenyl methyl chloroformate solution (FMOC, Agilent Technologies)을 사용하였다. 아미노산 standard (Agilent Technologies)는 10, 100, 500, 1000 μ M 을 사용하였다.

Table 3. Operation conditions of HPLC analysis to determine contents of free amino acids.

Parameters	Conditions
Mobile phase A	40 mM sodium phosphate dibasic (pH 7.8)
Mobile phase B	water-acetonitrile-methanol (10:45:45, v/v/v)
Composition	Multi-step gradient : 0-55% B (0-24 min), 55-80% B (24-24.5 min), 80-80% B (24.5-26 min), 0% B (26.5-30 min)
Column	VDSpher 100 C18-E column (4.6 x 150 mm i.d., 3.5 μ m; VDS optilab, Germany)
Flow rate	1.5 mL/min
Detection Wavelength	fluorescence wavelength (excitation: 340 nm; emission: 450 nm)
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Instrument	Ultimate 300 HPLC systems

2.5. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성 측정

콩, 다시마 혼합 발효물 45 μ L를 ACE solution (0.1M sodium borate buffer containing 0.3 M NaCl, and 10 munits/mL of ACE, pH 8.3) 45 μ L와 혼합하여 37°C에서 10 분간 반응시킨 후 3 mM hippuryl-histidyl-L-leucine (HHL)을 45 μ L 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 30 분 후 1N HCl 150 μ L를 첨가하여 반응을 중지시키고 최종 혼합물을 0.2- μ m PVDF membrane filter로 여과하여 HPLC로 hippuric acid (HA)의 양을 분석하였다. HPLC 분석 시 사용한 기기와 분석 조건은 Table 4에 기재하였고, ACE 저해 활성은 아래의 공식에 근거하여 계산하였다. IC₅₀는 ACE 활성을 50% 저해하는 물질의 농도로 정의하였다 (24, 25).

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = [(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100$$

Ac : area of HA peak without the sample (added buffer and ACE)

As : area of HA peak with the sample and ACE

Ab : area of HA peak without ACE (added buffer and sample)

Table 4. Operation conditions of HPLC analysis of ACE inhibitory activity.

Parameters	Conditions
Mobile phase A	Water (containing 0.1% (v/v) of TFA)
Mobile phase B	Acetonitrile
Composition	Multi-step gradient : 15–75% B (0–12 min), 75–100% B(12–15 min), 100% B (15–17 min), 100–15% B(17–18 min), 15% B (18–30min)
Column	ZORBAX SB C ₁₈ , 4.6 x 250 mm id, 5 μm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL
Detection Wavelength	228 nm
Column temperature	25 °C
Instrument	Dionex P680 HPLC

2.6. *in vitro* 소화 시뮬레이션

콩, 다시마 혼합 발효물을 섭취했을 때 소화에 의한 ACE 저해 활성의 변화를 확인하기 위해서 *in vitro* 소화 시뮬레이션을 수행하였다. 콩, 다시마 혼합 발효물을 동결 건조한 후 pepsin solution (enzyme:substrate=1:100, w/w, pH 2.0) 500 μ L를 건조한 콩, 다시마 혼합 발효물 30 mg에 첨가하여 37℃에서 5 시간 동안 가수분해하였다. Pepsin에 의해 가수분해된 발효물은 NaOH로 pH를 7로 조절하고 10 분간 끓여서 불활성화 시켰다. Pepsin 가수분해물을 동결 건조한 후 trypsin과 α -chymotrypsin을 혼합한 효소액 (each enzyme:substrate =1:200, w/w, pH 8.0) 500 μ L를 첨가하여 37℃에서 5 시간 동안 가수분해하였다. 10 분간 끓여 효소 반응을 종결하고 콩, 다시마 혼합 발효물 가수분해물 (fermented soybean hydrolysate, FSH)은 14,000 $\times g$, 4℃에서 3 분간 원심 분리하여 얻어진 상정액으로 ACE 저해 활성을 확인하였다 (19, 26).

2.7. ACE 저해 활성 분획의 구성 펩타이드 확인

콩, 다시마 혼합 발효물 가수분해물 (FSH)에서 ACE 저해 활성이 가장 높은 분획을 얻기 위하여 분자량을 기준으로 Ultrafiltration (UF)을 하였다. FSH를 14,000 xg, 4°C에서 3 분간 원심 분리 한 후 상정액을 0.2- μ m PVDF membrane filter로 여과하였다. 여과한 FSH를 UF membrane filter (Amicon Ultra, Millipore)로 여과하여 3 kDa 미만, 10 kDa 미만, 가수분해물 원액으로 분획을 설정하였다 (27). 분자량을 기준으로 여과한 분획들은 다음과 같이 명명하였다: FSH I (unfractionated FSH, 가수분해물 원액), FSH II (MW<10 kDa, 분자량 10 kDa 미만 가수분해물), FSH III (MW<3 kDa, 분자량 3 kDa 미만 가수분해물).

3 개의 분획 중 ACE 저해 활성이 가장 높은 분획을 선택하여 nano-liquid chromatography-electro spray ionization tandem mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS/MS)로 분석하였고 분획 내에 존재하는 펩타이드의 아미노산 서열과 분자량을 확인하였다. 본 실험은 서울대학교 기초과학공동기기원 (National Center for Inter-University Research Facilities, NCIRF)에서 수행하였다. MS system은 Dual Cell Linear Ion Trap 과 Orbitrap Mass spectrometer (Thermo Scientific)로 구성된 기기를 사용하였고 ion charge 는 2+, 3+, 4+ 로 설정하였다. 펩타이드의 아미노산 서열과 분자량은 SEQUEST 와 NCBI nr protein database (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)에서 검색하여 parent protein을 확인하였다.

ACE 저해 활성 펩타이드에 대한 정보와 유사 서열은 BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>)에서 검색하여 ACE 저해 활성 펩타이드가 있는지 비교하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. *A. oryzae*, *B. subtilis*와 *L. brevis*의 GABA 생성능 비교

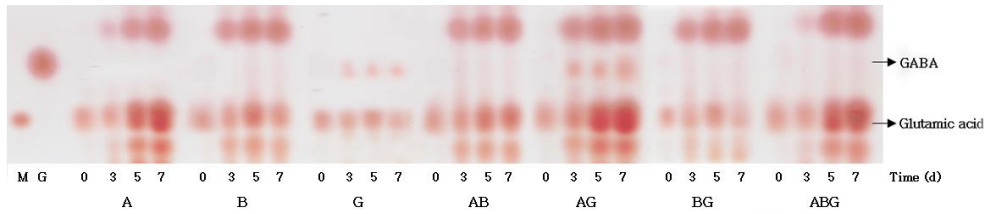
A. oryzae FMB S46471, *B. subtilis* natto와 *L. brevis* GABA 100 세 균주를 SB-STE 배지에 접종하여 7 일간 발효한 결과, group G와 AG에서만 GABA가 생성되었음을 확인하였다 (Fig 1A). 두 group의 공통 균주인 *L. brevis* GABA 100은 glutamic acid decarboxylase (GAD)를 분비하는 GABA-producing lactic acid bacteria로 본 연구에서 유일하게 GABA를 생성할 수 있는 균이나 (22), 단독 접종 시 유리아미노산을 생성하지 않는 것으로 보아 protease 활성은 낮은 경향을 보였다.

반면, *L. brevis* GABA 100을 접종한 group BG와 ABG에서는 GABA가 생성되지 않았는데, *A. oryzae* FMB S46471과의 공동 배양과는 달리 *B. subtilis* natto의 protease 활성은 *L. brevis* GABA 100의 GAD 활성을 억제하는 것 사료된다. 또한 *B. subtilis* natto 접종량을 증가시켜 SB-STE에서 배양했을 때 TLC plate에서 glutamic acid의 양이 감소하고 점질물이 발생한 점으로 보아 *B. subtilis* natto가 glutamic acid를 소비하여 poly γ -glutamate를 생성하는 점과 관련이 있는 것으로 보였다 (data not shown) (28). Glutamic acid의 감소는 GABA 생성을 증가시키는 목적과 반대되는 양상이므로 *B. subtilis* natto는 추후 실험에서 제외되었다

A. oryzae FMB S46471 역시 유리아미노산을 생성하였고 이는 *B. subtilis* natto보다 protease 활성이 더 높은 것으로 나타났다. *A. oryzae* FMB S46471의 강력한 protease 활성에도 불구하고 GAD의 활성은 저해되지 않고 GABA를 생성하였다. 또한 공동배양 시 pH 범위가 GAD의 최적 pH인 pH 5.0에 가까운 환경을 조성하는 것을 확인하였다 (Fig 1B). 이 결과를 토대로 *A. oryzae*

FMB S46471와 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양하는 조건으로 GABA 생성 최적 발효 조건을 설정하였다.

(A)



(B)

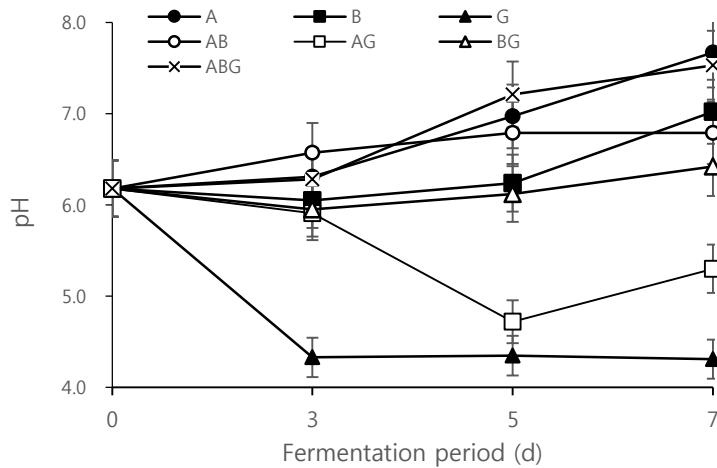


Fig 1. Production of amino acids and GABA by *A. oryzae*, *B. subtilis*, and *L. brevis* GABA 100. M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids; (B) Change of pH in SB-STE during fermentation, symbols: (●), group A; (■), group B; (▲), group G; (○), group AB; (□), group AG; (△), group BG; (×), group ABG (refer to Table 1 for abbreviations).

3.2. 콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 생성 최적 발효 조건

3.2.1. *L. brevis*의 접종 시점 및 *A. oryzae*와 *L. brevis*의 접종량에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

L. brevis GABA 100의 접종시점에 대해 비교한 결과는 Fig 2A와 같다. *A. oryzae* FMB S46471은 *L. brevis* GABA 100에 비해 강력한 단백 분해력을 보여주었으나, *A. oryzae* FMB S46471이 단백질을 분해하여 유리아미노산을 생성하기까지 접종일로부터 최소 3일정도 소요되었다. 이 점을 근거로 하여 *A. oryzae* FMB S46471의 접종 시점은 발효 시작일로 고정하였고 7 일간 단기 발효를 하면서 콩, 다시마 혼합 발효물이 protease에 가장 오랜 시간 노출될 수 있도록 하였다. 또한 *L. brevis* GABA 100을 단일 접종하는 경우 (group G0), 24 시간 이내에 pH가 4.3으로 낮아지기 때문에 GAD의 최적 활성 pH로 알려진 pH 5.0 보다 낮아 GABA 생성이 어려운 조건을 형성하였다 (Fig 2B).

A. oryzae FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양하였을 때, 가장 GABA 생성이 많았던 group A0G3는 *A. oryzae* FMB S46471의 protease가 단백질을 분해하여 유리아미노산이 나타나기 시작하는 시점에 *L. brevis* GABA 100을 접종하여 *A. oryzae* FMB S46471의 protease 활성화에 의해 나타나는 pH 증가와 *L. brevis* GABA 100이 분비하는 유기산에 의한 pH 저하가 상쇄되는 효과가 있었다. Group A0G3은 발효 7 일차까지 pH 5.2-5.6 수준을 나타냈고 GAD의 최적 활성 pH 5.0에 근접하여 GABA 생산을 지속적으로 유지할 수 있었음을 확인하였다.

A. oryzae FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100의 접종량과 관련한 실험에서는 비교 그룹 간 GABA 생성 정도가 유사했으나 *A. oryzae* FMB S46471 접종량을 증가시켰을 때 pH가 지속적으로

증가하였고, *L. brevis* GABA 100의 접종량을 증가시켰을 때 pH 와 GABA 생성 두 요인 모두 감소하는 현상을 보였다. 따라서 pH 변화를 고려하여 *A. oryzae* FMB S46471은 10^4 spores/mL, *L. brevis* GABA 100은 1% (v/v) 수준으로 접종하는 것으로 결정하였다 (data not shown).

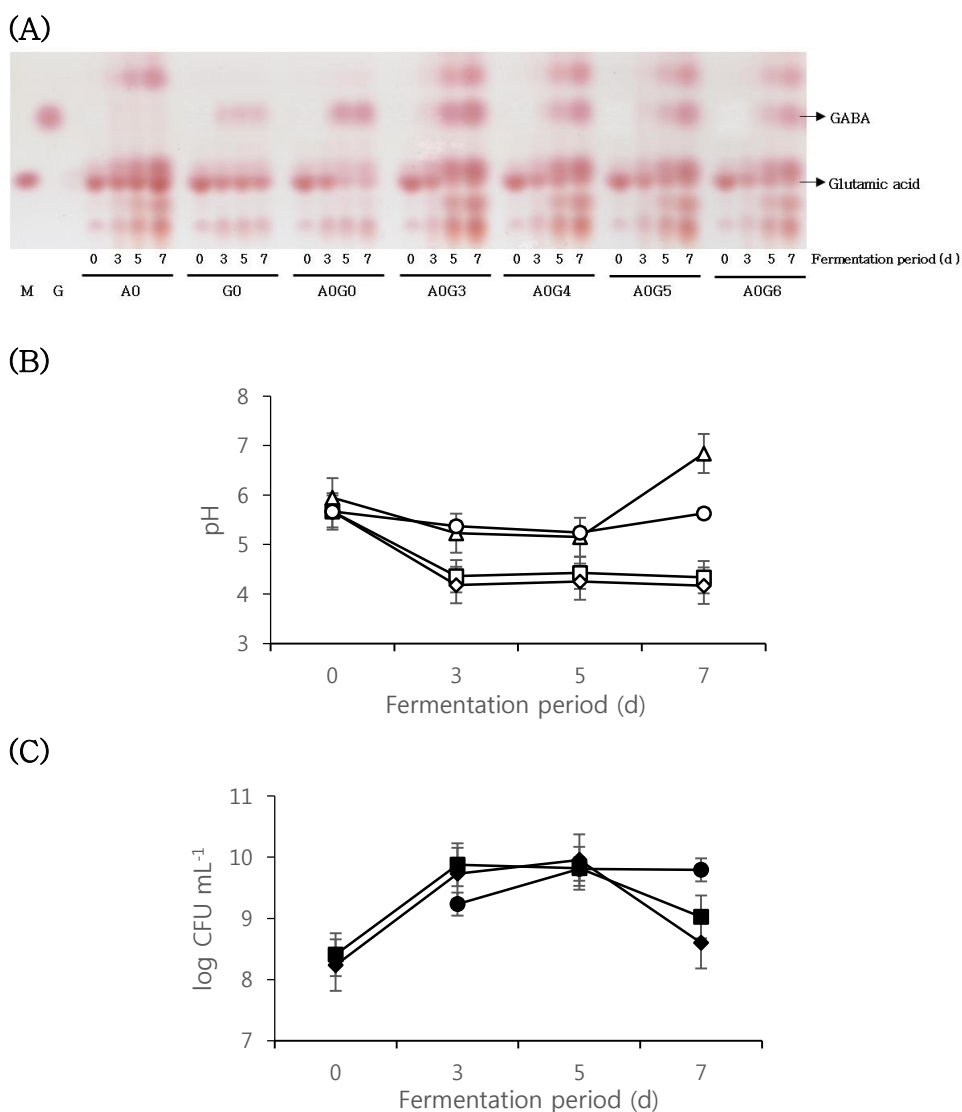


Fig 2. Effect of inoculation time point of *L. brevis* GABA 100 on the GABA production. M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids on TLC plate; A, *A. oryzae* FMB S46471; G, *L. brevis* GABA 100; The inoculation date of each microorganism was written on the right of microorganism abbreviation in fermented groups; (B) change of pH and (C) change of cell viability in SB-STE during fermentaton; triangle, group A0; square, group G0; diamond, group A0G0; and circle, A0G3.

3.2.2. 발효 온도와 pH에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

L. brevis GABA 100의 특성 연구 (characterization)를 먼저 수행하여 GABA를 생성하는 최적 온도와 pH를 확인한 결과, 3% MSG를 첨가한 MRS broth에서 *L. brevis* GABA 100은 각각 30℃와 pH 5.0에서 MSG를 GABA로 가장 많이 전환하였음을 확인하였다 (data not shown).

SB-STE에서 *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 공동 배양했을 때 또한 30℃에서 가장 많은 GABA가 생성되었고 (Fig 3A), 발효 기간 동안 SB-STE의 pH 범위가 5.0-6.0 사이로 나타났다. 아미노태 질소와 GABA 생성에 의한 pH 증가 및 *L. brevis* GABA 100의 유기산 생성에 의한 pH 감소를 상쇄하여 GAD 최적 활성 pH에 근접한 수준임을 보였다 (Fig 3B).

SB-STE에서 GABA 생성을 위한 최적 pH는 초기 pH 4.0일 경우를 제외하고는 GABA 생성이 전체적으로 유사하게 나타났다. 초기 pH가 낮으면 *A. oryzae* FMB S46471가 접종된 시점부터 생장이 억제되어 유리아미노산 생성량도 줄어드는 것으로 사료된다 (data not shown). 따라서 SB-STE에서 GABA 생성을 위한 발효 조건으로는 발효 온도 30℃를 유지하고 본래 쿵, 다시마 혼합 발효물의 초기 pH인 pH 6.0에서 발효를 시작하여 발효 기간 동안 pH 변화를 보며 pH가 5.0-6.0 수준으로 유지되는지 확인하였다.

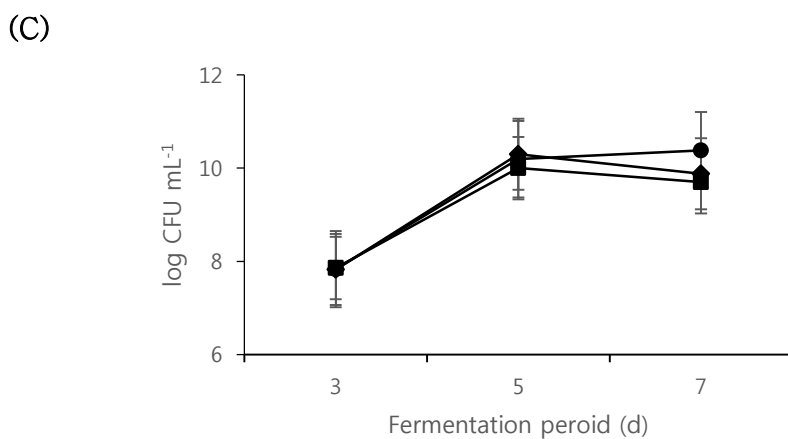
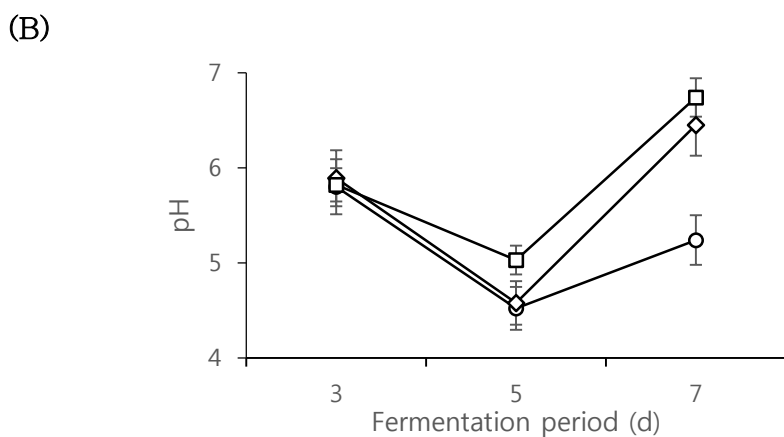
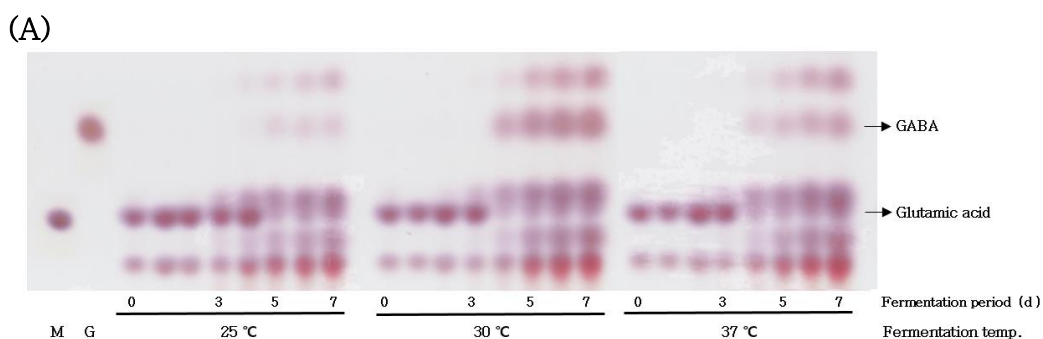
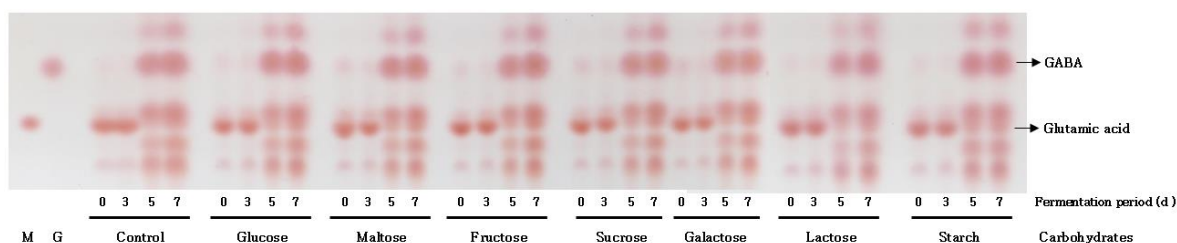


Fig 3. Effect of fermentation temperature for GABA production in SB-STE. M, MSG; G, GABA; (A) patterns of free amino acids on TLC plate; (B) change of pH and (C) change of cell viability in SB-STE during fermentation; circle, 25 °C; diamond, 30 °C; square, 37 °C.

3.2.3. 탄소원 첨가에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

SB-STE에 1% (v/v) 수준으로 탄소원을 첨가한 후 7 일간 발효하였을 때 나타난 GABA 생성은 다음과 같다 (Fig 4A). 탄소원 첨가 그룹의 경우, 탄소원의 종류와 관계없이 탄소원 무첨가 그룹 (control)보다 GABA 생성량이 유사하거나 약간 적게 나타났고 대조군을 제외한 전체 그룹이 발효 5 일차에 pH 4.5 이하로 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig 4B). 본 실험에서는 탄소원의 첨가가 *L. brevis* GABA 100의 대사에 따른 유기산 생성을 증가시키고 pH 감소로 인한 GAD 활성 억제를 고려하여 추후 실험에서는 GABA 생산을 증진시키는 최적 조건 중 탄소원 첨가는 고려하지 않았다.

(A)



(B)

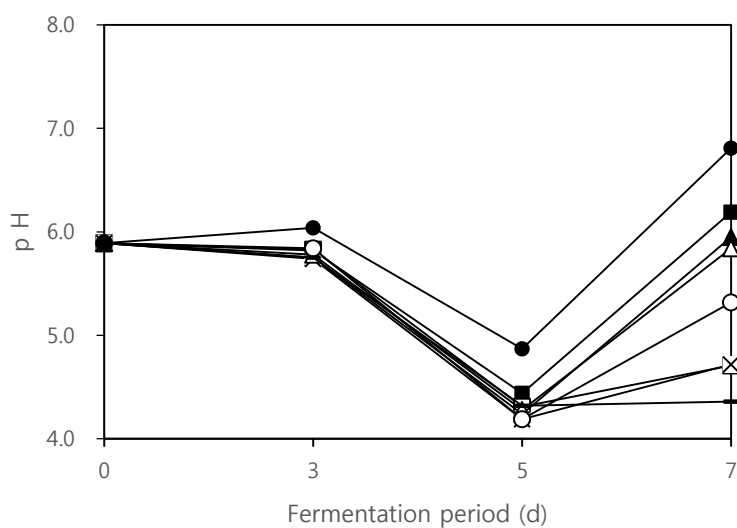


Fig 4. Effect of various carbohydrates added into SB-STE on the production of GABA. M, MSG; G, GABA; (A) pattern of free amino acids on TLC plate; (B) change of the pH in SB-STE during fermentation; ●, control; ■, glucose; ▲, galactose; △, fructose; ○, sucrose; □, lactose; x, maltose; —, starch.

3.2.4. 배지 내 콩, 다시마, 증류수 첨가 비율에 따른 발효 중 GABA 생성 효과

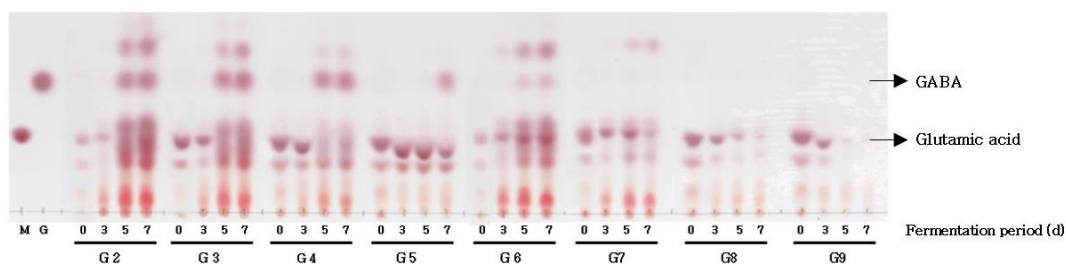
배지를 구성하는 콩과 다시마, 증류수의 비율에 따른 GABA 생성 결과는 Fig 5와 같다. GABA 생성량은 다시마보다 콩의 함량이 증감할 때 영향을 더 크게 받는 것으로 나타났고 이는 다시마의 첨가 형태 (STP, STE)와 상관없이 동일한 경향을 보였다 (Fig 5A). 다시마로만 구성된 group G5와 G9의 유리 아미노산 패턴을 토대로 다시마는 단백질보다 주로 glutamate를 제공하는 역할을 확인하였다.

다시마의 첨가 형태에 따른 GABA 생성에서는 다시마 분말 첨가그룹 (group 2-5)이 다시마 추출물 첨가그룹 (group 6-9)보다 GABA 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 첨가한 콩의 중량이 동일함에도 유리아미노산과 GABA 생성 정도에 차이가 있는 것은 다시마의 열수 추출 과정에서 *A. oryzae* FMB S46471의 생장 또는 protease의 활성화에 필요한 일부 성분들이 추출되지 않았을 것으로 사료된다.

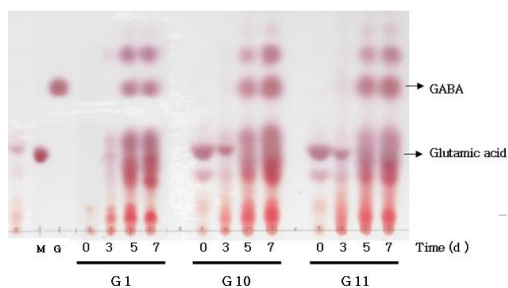
Fig 5B에서는, 콩 함량을 동일하게 설정하고 증류수 (group G1)를 첨가하는 대신 다시마추출물 (group G10) 또는 다시마 분말 (group G11)로 대체하여 발효하였을 때 GABA 생성이 더 증가하였고, 역시 다시마추출물보다 다시마 분말을 직접 첨가했을 때 GABA 생성 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. 또한 증류수를 첨가했을 때보다 다시마를 첨가했을 때 GAD 최적 활성 조건인 pH 5.0에 더 가까운 환경을 조성하여 발효 후반까지 일정 수준으로 유지하는 현상을 보였다 (Fig 5C). 즉, 콩 발효식품을 제조할 때 다시마를 첨가하는 것은 GABA로 전환될 수 있는 glutamic acid의 양을 증가시키고 GAD의 최적 조건인 pH인 5.0에 가깝게 유지할 수 있다는 장점이 있었다.

또한 배지에 첨가하는 수분량에 따라 GABA 생성량도 차이가 있었고 각 그룹의 유리 아미노산과 GABA는 첨가한 수분량이 증가할수록 TLC plate 상에서 강한 발색을 나타냈다 (Fig 6A). *L. brevis* GABA 100은 호기보다 혐기적인 조건에서 생균수가 더 오래 유지되고 GABA 생성이 촉진된다 (29). 수분량의 증가는 배지 내에서 일부 혐기 조건을 형성할 수 있기 때문에 증류수 및 다시마 추출물 함량이 증가함에 따라 GABA 함량은 증가하고 pH가 감소하는 것은 *L. brevis* GABA 100의 특성이 반영된 결과라고 보여진다 (Fig 6B). 또한 배지 구성이 동일하나 수분 첨가량이 증가할수록 유리 아미노산이 진하게 나타나는 것으로 보아 *A. oryzae* FMB S46471이 수분 함량이 높은 환경에서 생육이 촉진되는 것으로 사료된다.

(A)



(B)



(C)

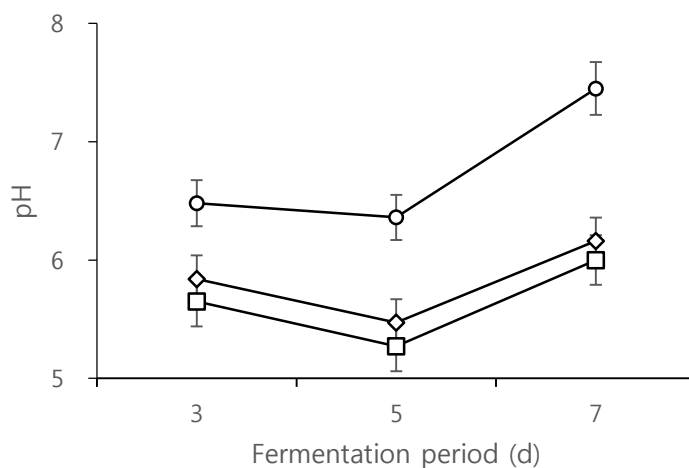


Fig 5. Effect of various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle used for fermentation and production of GABA. M, MSG; G, GABA; (A), (B) patterns of free amino acids on TLC plate after fermentation with various medium composition (refer to Table 2 for details); (C) changes of pH during fermentation; circle, group G1; diamond, G10; and square, G11.

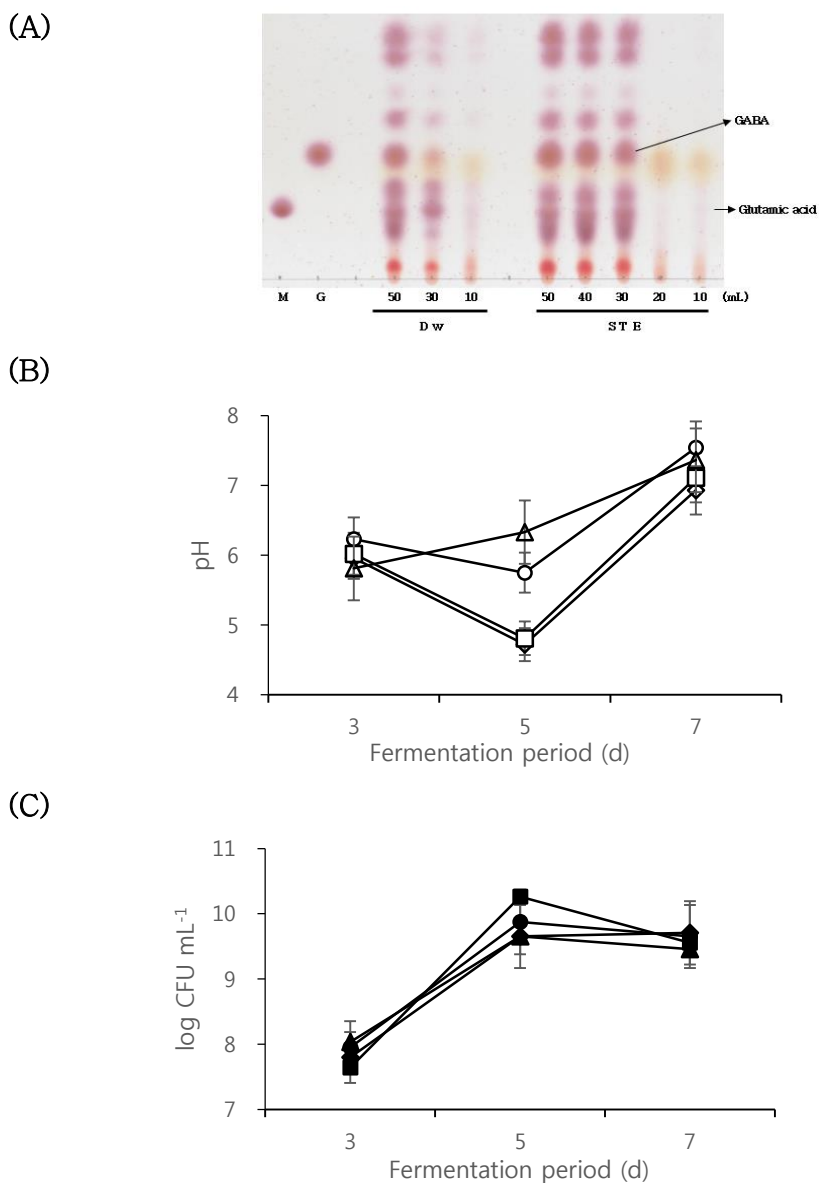


Fig 6. Effect of different water content on GABA production. M, MSG; G, GABA; (A) patterns of free amino acids on TLC plate; STE, sea tangle extract; the amount of soybean and sea tangle were same in whole groups (refer to Table 2 for details); (B) change of cell viability and (C) change of pH during fermentation; circle, group DW50; diamond, STE50; square, STE40; and triangle, STE30.

3.3. HPLC를 이용한 유리 아미노산 정량 분석

GABA 생성 최적 발효 조건들을 모두 적용하여 콩, 다시마 혼합 발효를 진행하였고 HPLC로 GABA 및 유리 아미노산 정량 실험을 수행하였다. SB-STE 배지에 첨가한 다시마추출물의 고형분은 50 mL을 기준으로 약 1.61 g이었고 발효 7 일 후 GABA 함량은 약 1.89 g/kg으로 나타났다. 다시마 분말을 첨가한 SB-STP에서는 GABA 함량이 약 1.92 g/kg으로 SB-STE 보다 약간 높은 수치를 보였다 (Table 5). 물을 첨가하여 발효한 콩 (SB-DW)의 경우 GABA 함량은 1503.1 mg/kg으로 다시마를 첨가하지 않아도 상당히 많은 양의 GABA를 형성하였는데 앞서 언급하였던 연구 결과 중 GABA 함량은 다시마보다 콩 함량에 더 많은 영향을 받는다는 점과 관계가 깊다.

SB-DW의 경우 다시마를 첨가하지 않았지만 GABA 생성을 위한 최적 발효 조건을 적용했기 때문에 GABA 생성량이 증대된 것으로 사료된다. 이는 시중에서 구매한 된장과 메주에서 TLC로 분석했을 때 GABA가 나타나지 않은 반면 본 연구의 발효 7 일차 SB-DW, SB-STE, SB-STP에서는 GABA가 생성된 점에 근거한다 (data not shown).

본 연구에서 얻은 GABA 함량은 한국 재래식 된장에 비해 상당히 높은 편인데, 한 연구에 따르면 1, 3, 5, 6, 10 년 동안 담근 된장에서 GABA 함량은 각각 43.8, 120.6, 569.5, 930.7, 1938.7 mg/kg으로 나타났다 (30). 콩, 다시마 혼합 발효물은 발효 기간이 짧음에도 불구하고 GABA를 생성하는 특정 균주 사용과 다양한 발효 조건에 대해 최적화한 결과를 적용하여 발효했기 때문으로 보인다.

식품의약품안전처 (KFDA)에서는 L-monosodium glutamate로부터 만든 GABA를 20 mg/day로 섭취했을 때 혈압 조절 효과가 있음을

인정하고 건강기능식품 개별인정원료로 등록하였다. 4 주 동안 spontaneously hypertensive rats (SHR)에게 0.15% GABA를 함유한 식이를 주었을 때 0% GABA 함유 식이 그룹보다 혈압이 낮아졌다고 보고하였고 (31), 또 다른 연구에서는 경증 고혈압 환자가 매일 10 mg의 GABA를 12주 동안 섭취하여도 효과가 있었다고 보고하였다 (32). 또한 GABA 함량이 높은 soy sauce (0.033 mg/kg body weight)를 첨가한 식이는 소금 섭취에 의한 고혈압 증가를 약화시켰고 (33), 2.8 mg/g의 GABA를 함유한 뽕나무잎열수추출액은 섭취량에 따라 수축기 혈압을 낮출 뿐만 아니라 고 용량으로 섭취했을 때 GABA만 처리한 그룹보다 더 수축기 혈압이 낮아졌음을 보고하였다 (34). 그러므로, 식품의 형태로 GABA를 섭취하는 것은 혈압을 조절하는데 도움이 될 수 있을 것으로 보고 이 연구에서의 콩, 다시마 혼합 발효물의 GABA 함량은 혈압 조절 기능성을 기대하기에 충분하다고 판단되었다.

Table 5. Change of free amino acids in fermented soybeans during fermentation.

Amino acid	Amino acid contents (mg/kg)					
	SB-DW (G1)		SB-STE (G10)		SB-STP (G11)	
	0 day	7 day	0 day	7 day	0 day	7 day
Asp	56.0	1390.7	797.4	1219.1	749.8	950.0
Glu	46.2	1058.6	1384.2	936.1	1413.6	389.2
Asn	40.5	22.3	36.8	61.78	37.7	628.2
Ser	6.3	499.8	19.4	197.2	15.7	658.0
Gln	–	309.1	–	532.1	–	536.5
His	8.7	382.5	5.3	429.9	5.3	254.3
Gly	6.0	460.5	8.9	281.4	8.7	404.6
Thr	4.7	353.7	13.1	332.1	13.1	343.8
Arg	135.8	18.7	111.0	9.8	105.1	156.7
Ala	20.34	564.8	94.1	412.3	95.5	540.4
GABA	16.3	1503.1	104.8	1894.1	50.6	1919.7
Tyr	9.7	579.1	12.0	531.4	10.6	503.7
Val	6.1	694.1	13.1	706.0	13.0	624.0
Met	3.2	140.1	3.2	120.9	4.7	149.7
Trp	44.0	727.3	48.6	748.1	45.3	376.3
Phe	13.0	710.7	19.2	764.4	17.7	807.7
Ile	4.9	722.0	8.2	728.8	7.7	659.0
Leu	5.5	961.5	11.4	1046.7	9.5	1091.1
Lys	11.6	652.9	18.3	884.9	16.7	645.3
Pro	5.3	141.7	68.6	267.7	66.0	466.8

SB, soybean; DW, distilled water; STE, sea tangle extract; STP, dried sea tangle powder.

The most GABA-riched fermented soybeans were selected as a result of 2.3.5.

3.4. 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성

본 연구에서는 GABA 외에 또 다른 생리 활성을 줄 수 있는 ACE 저해 활성에 대하여 분석하였다. SB-STE 배지에서 접종 균주별 ACE 저해 활성 (%) 결과는 Fig 7에 나타내었다. *A. oryzae* FMB S46471 (group A0)은 다른 두 균주 (group B0, G0)보다 ACE 저해 활성이 높았고, 전체 그룹 중에서 ACE 저해 활성이 상대적으로 높은 4 개 그룹의 공통점도 *A. oryzae* FMB S46471를 접종했다는 공통점을 확인하였다. 이 중 group A0G3는 ACE 저해 활성뿐만 아니라 유일하게 GABA를 생성한 그룹이었기 때문에 다음 실험에서는 group A0G3 조합으로 접종하여 GABA 생성과 ACE 저해 활성이 높은 콩, 다시마 혼합 발효물을 조사하였다.

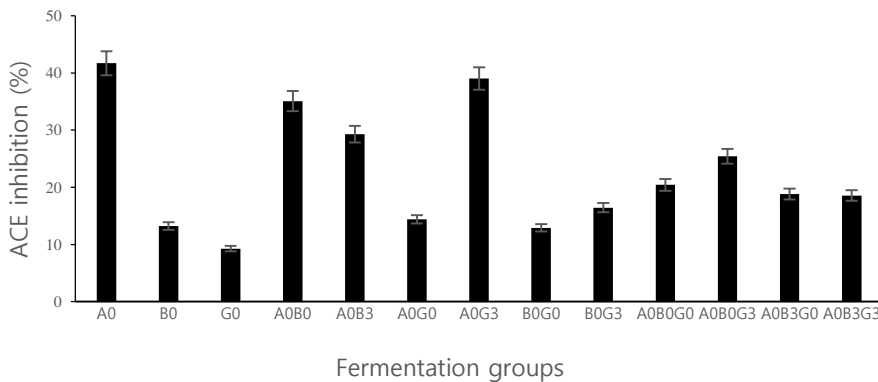


Fig 7. ACE inhibitory activities of fermented soybeans depending on the inoculation combination. A, *A. oryzae* FMB S46471; B, *B. subtilis* natto; G, *L. brevis* GABA 100. The inoculation date of each microorganism was written on the right of the microorganism abbreviation in the fermented groups.

Fig 8의 콩, 다시마 혼합 발효물은 ACE 저해활성이 최소 77.9% 이상으로 나타났고 그 중 group G10과 G11의 경우 1:100 비율로 희석하여도 54.7% 이상의 저해 활성을 보였다. 배지를 구성하는 콩과 다시마의 비율 또한 ACE 저해 활성에 차이를 보였고 특히 TLC 분석법에서 나타난 유리 아미노산의 생성 경향과 유사한 결과를 나타냈다. 유리 아미노산 함량이 많을수록 ACE 저해 활성이 높았기 때문에 배지 성분이 얼마나 가수분해가 되었는지가 중요한 요인이고, GABA 생성량 또한 유리 아미노산 중 glutamic acid의 함량이 많을수록 증가하기 때문에 GABA 생성 최적 조건에서 ACE 저해 활성은 GABA 생성량과 연관이 있음을 알 수 있다.

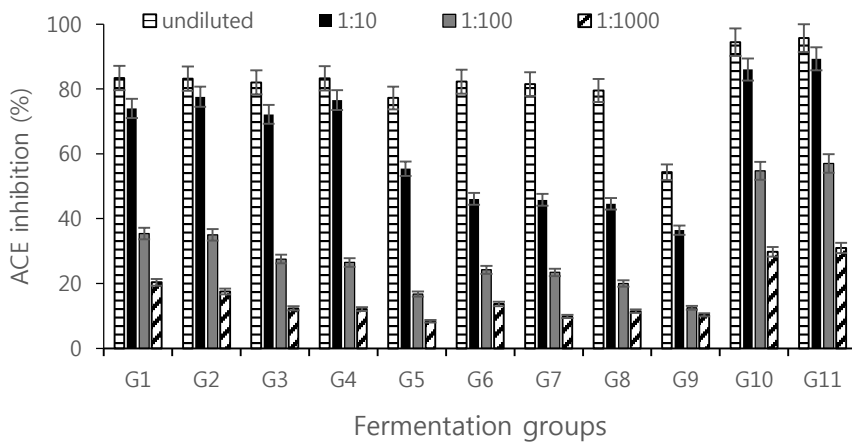


Fig 8. The ACE inhibitory activity by various medium composition with different ratio of soybean, sea tangle used for fermentation and production of GABA. ▨, the result of ACE inhibition with undiluted samples; ■, diluted at a ratio of 1:10; ▣, a ratio of 1:100; and ▤, a ratio of 1:1000; the composition of each group was based on the Table 2.

콩, 다시마 혼합 발효물을 1:100 비율로 희석한 후 소화 효소 (pepsin, trypsin, α -chymotrypsin)를 첨가하여 가수 분해했을 때 발효 전, 후 및 소화 후 ACE 저해 활성은 Fig 9과 같다. 발효 전 단계에서 모든 그룹은 10 % 미만으로 나타났고 발효를 거치면 ACE 저해 활성이 급격하게 증가하여 group G10과 G11의 경우 54.7-57.0% 수준으로 측정되었다. 발효 후의 ACE 저해 활성은 소화 효소를 처리 했을 때 일부 감소하는 경향이 있었는데, group G10과 G11는 다른 그룹에 비해 소화 후 ACE 저해 활성이 31-36% 정도 감소했음에도 약 40.3%의 ACE 저해 활성을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 발효는 ACE 저해 활성을 향상시키는 중요한 과정이고 발효 중 가수분해 정도가 높을수록 소화 후에도 ACE 저해 활성이 높은 것으로 나타났다.

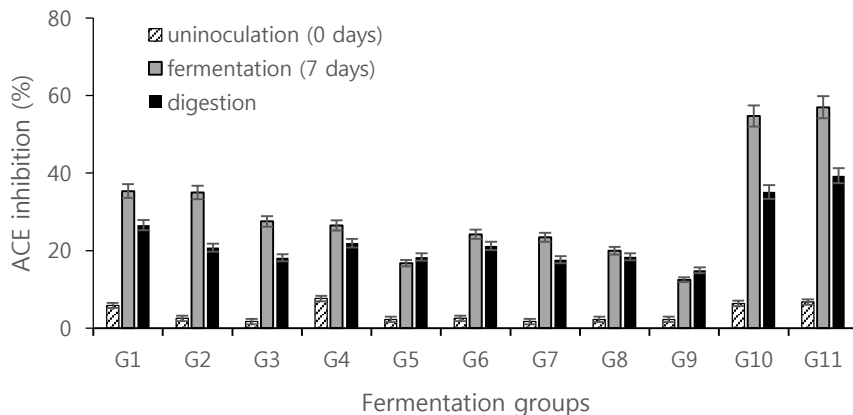


Fig 9. Changes of the ACE inhibitory activity from uninoculation to digestion. ▨, uninoculated soybean at the beginning of fermentation; ▩, soybean fermented for 7 days; ■, fermented soybeans diluted at a ratio 1:100, and digested by gastrointestinal enzymes. The composition of each medium was based on the Table 2.

GABA 생성 최적화 조건에서 발효한 콩, 다시마 혼합물은 시중에서 판매하는 전통 된장 및 메주와 비교했을 때도 ACE 저해 활성이 높게 나타났다. 전통 된장 (group D1-D4)과 메주 (group M1)는 1:100 비율로 희석 시 ACE 저해 활성이 22.2-31.8%, 소화 효소 처리 후 13.9-24.3%를 보인 반면, GABA 생성 최적화 조건에서 발효한 group G11의 경우 1:100 비율로 희석 시 43.2%, 희석액을 소화 효소 처리한 후 35.1%로 나타났다 (Fig 10). 또한 TLC로 free amino acids를 분석한 결과, 시중에서 구매한 된장과 메주 모두 GABA가 나타나지 않았다 (data not shown). 따라서 Group G11은 단기간의 발효에도 GABA 및 ACE 저해 활성이 높게 나타나 생리활성을 증가시킨 기능성 식품 소재로 사용할 수 있을 것으로 보인다.



Fig 10. The ACE inhibitory activity of the short-course fermentation (G11) and traditional fermented soybean products in market. G11; group G11 (refer to Table 2 for details); D1 to D4, four different *Doenjang* purchased from the local market; M1, *Meju* purchased from the local market; ■, diluted fermented soybean at a ratio of 1:100; ▤, fermented soybean diluted at a ratio of 1:100, and digested by gastrointestinal enzymes.

3.5. ACE 저해 활성 분획의 구성 펩타이드 확인

콩, 다시마 혼합 발효물에서 GABA 함량과 ACE 저해 활성이 높게 나타났고 1:100 비율로 희석하여 소화 효소를 처리하여도 약 35%의 ACE 저해 활성이 나타나 섭취 후의 ACE 저해 활성도 기대할 수 있었다. 콩, 다시마 혼합 발효물의 가수분해물을 UF membrane filter로 분획하였을 때, 각 분획의 ACE 저해 활성은 Table 6에 나타내었다. 전반적으로, ACE 저해 활성 (%)은 각 분획 별로 유사하였고 3 kDa 이하 분획에서 IC₅₀가 11.69 µg/mL로 가장 효과적인 것으로 나타났다. 한 연구에 따르면 분자량이 작아질수록, ACE 저해 활성이 증가한다고 보고 하였고 (35), 또 다른 연구에서는 soy sauce, miso paste, natto, tofuyo 등의 콩 발효 식품이 각각 3.44, 1.27, 0.16, 1.77 mg/mL 의 IC₅₀를 나타내었다 (36). IC₅₀ 수치를 토대로 ACE 저해활성이 가장 높은 3 kDa 미만의 분획을 선택하여 그 분획을 구성하는 펩타이드에 대하여 조사하였다.

Table 6. The ACE inhibitory activities of fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated by molecular weight.

Fraction group	ACE inhibition (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
FSH I (unfractionated FSH)	66.0	68.4
FSH II (MW <10 kDa)	64.6	36.1
FSH III (MW < 3 kDa)	64.0	11.7

FSH III의 펩타이드 분석 결과에서는 총 9 종의 펩타이드를 확인하였고 모두 콩으로부터 유래하였음을 알 수 있었다 (Table 7). 이는 콩, 다시마 혼합 발효물에서 다시마가 glutamate를 제공하고 pH를 조절 또는 유지하는데 효과가 있지만 ACE 저해 활성에는 크게 기여하지 않는 것으로 보인다. 한 연구에서는 다시마가 ACE 저해 활성이 약 $14.4 \pm 0.4\%$ 로 조사되었는데 (37), 본 연구에서는 다시마를 1:100 비율로 희석 및 소화 효소처리까지 모두 마쳤을 때 다시마 분말의 경우 약 16.7%, 다시마 추출물의 경우 12.5%의 ACE 저해 활성을 나타냈다.

이번에 확인된 9종의 펩타이드는 이전엔 보고된 적 없는 새로운 서열로써, 서열 끝부분의 아미노산이 Arg, Lys인 것으로 보아 Arg과 Lys의 다음 부분을 가수분해하는 trypsin의 영향이 크게 작용한 것으로 보인다. 일반적으로 ACE 저해 활성을 갖는 펩타이드는 그 서열에 특정 아미노산이 있다고 알려져 있다. 펩타이드 서열의 C-말단에 Pro 또는 방향족 아미노산과 같이 고리 구조를 가진 아미노산이 있는 점과 N-말단에는 Leu, Ile과 같은 소수성, 지방족 아미노산이 있는 점이 특징이다 (38, 39).

이 중 WAMLGALGCVFPELLARNGVKFGEASWFK는 N-말단에 소수성 아미노산이 많은 부분을 차지하고 있고 C-말단에 Trp과 Phe이 있어서 ACE와 결합하기 좀 더 용이한 구조를 형성할 것으로 기대한다. 또한 VFDGELQEGR과 LQESVIVEISKK은 soybean oil body-associated proteins (OBAP)로부터 유래할 수 있는 polypeptides 또는 polypeptide fragments로서 Caco-2 cell의 콜레스테롤 흡수를 저해하여 심혈관계 질환을 치료 및 예방하는 기능성을 나타낸 soybean fraction의 구성 펩타이드로 확인되었다 (40). 따라서 생리활성을 가지는 펩타이드가 하나의 기능성만 가지고 있는 것이 아니라 여러 가지 기능성을 가질 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 콩, 다시마 혼합 발효물의 ACE 저해 활성에 대한 *in vitro* assay를 수행하여 혈압 조절 기능성이 있는 식품 소재로

제언하였으므로, 분리한 펩타이드와 ACE와의 molecular docking 구조를 예측하는 *in silico* 분석 또는 실제 섭취 시 효능을 보기 위한 *in vivo* 연구가 추가적으로 필요하다고 판단한다. 결과적으로 본 연구에서 개발한 콩, 다시마 혼합 발효물은 GABA 함량과 ACE 저해 활성이 높은 점을 토대로 혈압 조절을 위한 기능성 식품 소재로서의 이용 가치 가 있을 것으로 판단한다.

Table 7. Identified peptides in fermented soybean hydrolysate (FSH) fractionated below 3 kDa.

Sequences	Charge	m/z (Da)	Position	NCBI accession number Source protein
LQESVIVEISK	2	622.8587	309-319	gi 9967357 Alpha subunit of beta conglycinin, partial [Glycine max]
EEGQQQGEQR	2	594.7692	299-308	
GSEEEQDER	2	539.7177	74-82	gi 9967361 Alpha' subunit of beta-conglycinin, partial [Glycine max]
LQESVIVEISK	2	686.9056	325-335	
LQESVIVEISKK	2	686.9056	325-336	
DNPNWTSDDR	2	603.2662	788-796	gi 126406 Lipoxygenase-3 (Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3) [Glycine max]
QLEALIETLSK	2	622.8587	218-228	gi 571468558 Uncharacterized protein LOC102659859 [Glycine max]
WAMLGALGCV FPELLARNGVK FGEASWFK	4	800.1650	84-112	gi 115779 ChloroplasticChlorophyll a-b binding protein (LHCII type I CAB), precursor [Glycine max]
VNGNLVSPAIV LANAEVVEIITY NALSSKSAFQR HK	3	1293.0221	601-646	gi 356570978 Uncharacterized protein LOC100814134 [Glycine max]
VFDGELQEGR	2	575.2829	382-391	gi 15988119 Chain C, Crystal Structure Of Soybean Proglycinin A1ab1b Homotrimer [Glycine max]

4. 요약 및 결론

본 연구에서는, *A. oryzae* FMB S46471과 *L. brevis* GABA 100을 이용한 GABA 생성 최적화 조건을 설정하여 콩, 다시마 혼합 발효물을 개발하였고, GABA 생성 최적 발효 조건에서 나타난 GABA 함량은 최대 1.9 g/kg, ACE 저해 활성은 최대 96%로 나타났다. ACE 저해활성의 경우 1:100 희석 후 소화 효소를 처리하여도 약 40%의 ACE 저해 활성이 있었고, ACE 저해 활성이 가장 높은 분획에서는 IC₅₀가 11.7 µg/mL 수준으로 나타났으며 ACE 저해 활성 분획에서 9 종의 펩타이드를 확인하였다. 7일간 단기 발효한 콩, 다시마 혼합 발효물은 시중에서 판매 되는 전통 된장과 메주와 비교했을 때 GABA 함량 및 ACE 저해 활성이 모두 증진된 결과를 나타내었고, 이를 토대로 콩, 다시마 혼합 발효물은 혈압 조절과 관련된 기능성 식품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Koh KJ, Shin DB, Lee YC. 1997. Physicochemical properties of aqueous extracts in small red bean, mung bean and black soybean. *Korean J Food Sci Technol* 29: 854-859.
2. Park KB, Oh SH. 2007. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour Technol* 98: 1675-1679.
3. Thwe SM, Kobayashi T, Luan T, Shirai T, Onodera M, Hamada-Sato N, Imada C. 2011. Isolation, characterization, and utilization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. *Fish Sci* 77: 279-288.
4. Mody I, Dekoninck Y, Otis TS, Soltesz I. 1994. Bringing the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17: 517-525.
5. Aoki H, Furuya Y, Endo Y, Fujimoto K. 2003. Effect of γ -aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1806-1080.
6. Aoki H, Uda I, Tagami K, Furuya Y, Endo Y, Fujimoto K. 2003. The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1018-1023.
7. Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H. 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* 57: 490-495.
8. Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K,

- Sansawa H, Yamori Y. 2004. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br J Nutr* 92: 411-417.
9. Abdou AM, Higashiguchi S, Horie K, Kim MJ, Hatta H, Yokogoshi H. 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors* 26: 201-208.
 10. Oh SH, Soh JR, Cha YS. 2003. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J Med Food* 6: 115-121.
 11. Rhodes D, Handa S, Bressan RA. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol* 82: 890-903.
 12. Miwako K, Miyuki S, Akira Y, Koji Y. 1999. Accumulation of GABA in brown rice by high pressure treatment. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 46: 323-328.
 13. Park KB, Oh SH. 2007. Production of yogurt with enhanced levels of gammaaminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour Technol* 98, 1675-1679.
 14. Wang HF, Tsai YS, Lin ML, Ou AS. 2006. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food Chem* 96: 648-653.
 15. Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83: 1849-1865.
 16. Maruyama S, Mitachi H, Awaya J, Kurono M, Tomizuka N, Suzuki H. 1987. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of Rs1-casein. *Agric Biol Chem* 51: 2557-2561.
 17. Saito Y, Wanezaki K, Kawato A, Imayasu S. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci Biotech Biochem* 58: 1767-1771.
 18. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S,

- Takano T. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* 78: 777–783.
19. Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 9: 6245–6252.
 20. Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1541–1545.
 21. Kim NY, Lee JH, Lee IH, Ji GE. 2014. An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *J Food Prot* 77: 1010–1016.
 22. Kim JA, Park MS, Kang SA, Ji GE. 2014. Production of γ -aminobutyric acid during fermentation of *Gastrodia elata* Bl. by co-culture of *Lactobacillus brevis* GABA 100 with *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *Food Sci Biotechnol* 23: 459–466.
 23. Kim NY, Ji GE. 2014. Characterization of soybean fermented by aflatoxin non-producing *Aspergillus oryzae* and γ -aminobutyric acid producing *Lactobacillus brevis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57: 703–708.
 24. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637–1648.
 25. Wu CL, Lee CL, Pan TM. 2009. Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 57: 5035–5041.
 26. Marczak ED, Usui H, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW, Yoshikawa M. 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24: 791–798.
 27. Lee SH, Qian ZJ, Kim SK. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame

- protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 118:96–102.
28. Kunioka M, Goto A. 1993. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 867–872.
 29. Kim JA, Park MS, Kang SA, Ji GE. 2014. Production of γ -aminobutyric acid during fermentation of *Gastrodia elata* Bl. by co-culture of *Lactobacillus brevis* GABA 100 with *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *Food Sci Biotechnol* 23: 459–466.
 30. Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Choi KK, Kim HK, Yang H, Lee KW. 2011. Changes in contents of γ -aminobutyric acid (GABA) and isoflavones in traditional Korean *doenjang* by ripening periods. *J Korean Soc Food Nutr* 40: 557–564.
 31. Shizuka F, Kido Y, Nakazawa T, Kitajima H, Aizawa C, Kayamura H, Ichijo N. 2004. Antihypertensive effect of γ -amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *Biofactors* 22: 165–167.
 32. Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H. 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* 57: 490–495.
 33. Yamakoshi J, Fukuda S, Satoh T, Tsuji R, Saito M, Obata A, Matsuyama A, Kikuchi m, Kawasaki T. 2007. Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 165–173.
 34. Yang NC, Jhou KY, Tseng CY. 2012. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 132: 1796–1801.
 35. Puchalska P, Concepció Garcia M, Luisa Marina M. 2014. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in commercial soybean based infant

- formulas using HPLC-Q-TOF-MS. *Food Chem* 157: 62–69.
36. Kuba M, Tanaka K, Tawata S, Takeda Y, Yasuda M. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1278–1283.
 37. Ivanov SA, Garbuz SA, Malfanov IL, Ptitsyn LR. 2013. Screening of russian medicinal and edible plant extracts for angiotensin I-converting enzyme (ACE I) inhibitory activity¹. *Russ J Bioorganic Chem* 39: 743–749.
 38. Cheung HS, Wang FL, Ondetti Ma, Sabo EF, Cushman DW. 1980. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme: importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 255: 401–407.
 39. Balti R, Nedjar-Arroume N, Bougatef A, Guillochon D, Nasri M. 2010. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Res Int* 43: 1136–1143.
 40. Monsanto Technology Lic, “Oil body associated protein compositions and methods of use therefore for reducing the risk of cardiovascular disease”, US 10/511,669, April 17, 2003.

Abstract

To enhance the γ -Aminobutyric Acid (GABA) content, the optimized fermentation of soybean with added sea tangle extract was conducted at 30 °C, pH 5.0. *A. oryzae* FMB S46471 was initially inoculated and fermented for three days, followed by the subsequent inoculation with *L. brevis* GABA 100. After fermentation for seven days, the fermented soybean showed ca. 1.9 g/kg GABA and showed higher ACE inhibitory activity than the traditional soybean product. Furthermore, several peptides in the most ACE inhibitory fraction were identified. Novel fermented soybean enriched with GABA and ACE inhibitory material may be useful for the regulation of blood pressure.

Key words: γ -Aminobutyric Acid, Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity, *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus oryzae*, Soybean, Sea Tangle

Student number : 2013-21510